

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-056092
 (43)Date of publication of application : 03.03.1995

(51)Int.Cl.

G02B 21/16

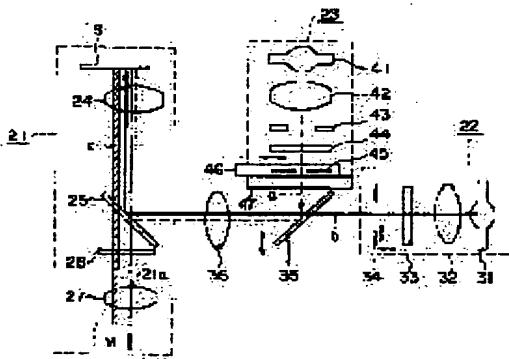
(21)Application number : 05-205161
 (22)Date of filing : 19.08.1993

(71)Applicant : OLYMPUS OPTICAL CO LTD
 (72)Inventor : TSUCHIYA ATSUHIRO
 IWASE MASAHIKI

(54) VERTICAL ILLUMINATING DEVICE

(57)Abstract:

PURPOSE: To improve the time and spatial resolving power by making the illumination range of photolysis light and the illumination range by exciting light settable arbitrarily. CONSTITUTION: This vertical illuminating device for irradiating a specimen S with first illuminating light formed by an illuminating optical system 22 for observation includes an illuminating optical system 23 for photolysis which forms the second illuminating light for inducing a photolysis reaction and irradiates the specimen with this light, a first diaphragm 34 which is arranged on the optical path of the illuminating optical system 22 for observation, regulates the illumination field of the first illuminating light and varies an opening shape, etc., and a second diaphragm 45 which is arranged in a position optically conjugate with the specimen S on the optical path of the illuminating optical system 23 for photolysis, regulates the illumination field of the first illuminating light and varies an opening shape, etc.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

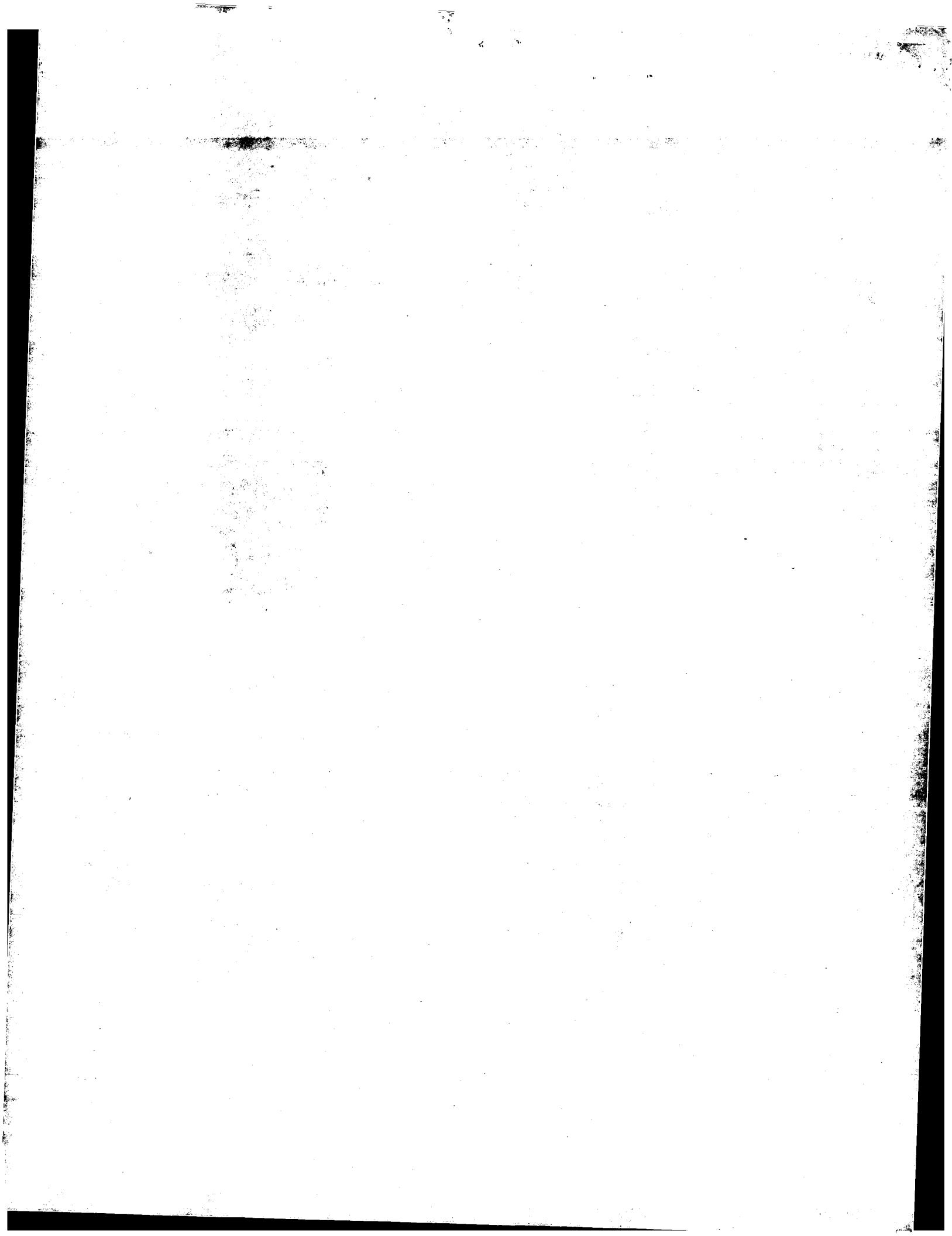
[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-56092

(43)公開日 平成7年(1995)3月3日

(51) Int.Cl.⁸

識別記号 庁内整理番号
7625-2K

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 1 O.L. (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平5-205161

(22)出願日 平成5年(1993)8月19日

(71)出願人 000000376
オリンパス光学工業株式会社
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72)発明者 土屋 敦宏
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ
ンパス光学工業株式会社内

(72)発明者 岩瀬 正明
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ
ンパス光学工業株式会社内

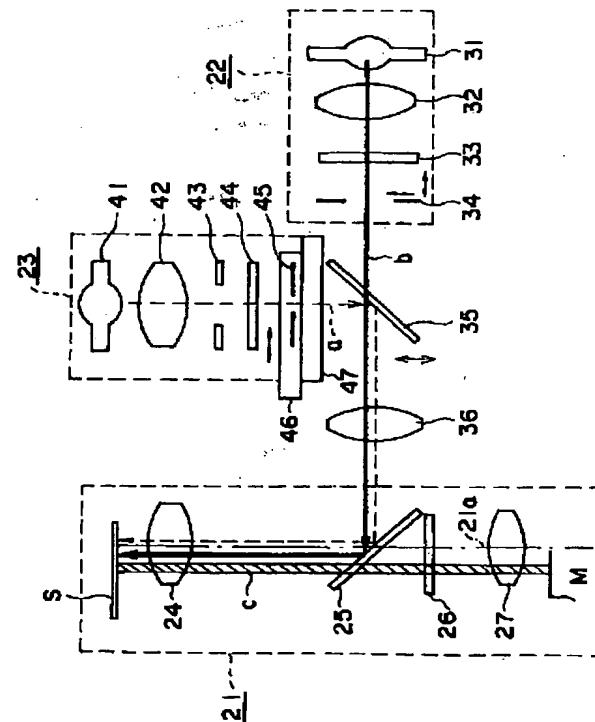
(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦

(54) 【発明の名称】 落射照明装置

(57) 【要約】

【目的】本発明は、フォトリシス光の照射範囲と励起光による照射範囲とを任意に設定可能で、時間的、空間的な分解能を改善することを目的とする。

【構成】観察照明光学系22で生成した第1の照明光を標本Sに照射する落射照明装置において、フォトリシス反応を起こさせるための第2の照明光を生成して標本Sへ照射するフォトリシス用照明光学系23と、観察照明光学系22の光路上に配置され第1の照明光の照野を規制し、開口形状等が可変の第1の絞り34と、前記フォトリシス用照明光学系23の光路上であって標本Sと光学的に共役な位置に配置され、第2の照明光の照野を規制し、開口形状等が可変の第2の絞り45とを具備して構成される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 標本からの光を結像して観察像を形成する観察光学系の光路上に波長選択性の光学素子を配置し、観察照明光学系で生成した第1の照明光を前記波長選択性素子に入射して前記観察光学系の光軸と同軸的に導光し、第1の照明光を前記標本に照射する落射照明装置において、

前記標本にフォトリシス反応を起こさせるための第2の照明光を生成し、その第2の照明光を前記標本へ照射するフォトリシス用照明光学系と、

前記観察照明光学系の光路上であって前記標本と光学的に共役な位置に配置され、前記第1の照明光の照野を規制し、開口形状、寸法、光軸方向位置及び光軸に垂直な面内における開口位置の少なくとも一つが可変の第1の絞りと、

前記フォトリシス用照明光学系の光路上であって前記標本と光学的に共役な位置に配置され、前記第2の照明光の照野を規制し、開口形状、寸法、光軸方向位置及び光軸に垂直な面内における開口位置の少なくとも一つが可変の第2の絞りとを具備したことを特徴とする落射照明装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、フォトアクチベーション、フォトイニアクチベーションと呼ばれる観察手法を用いて、生体組織中の細胞内外における Ca^{2+} 、ATP、タンパク質等の物質の局所的な変化、その変化の伝搬、その経時変化を観察または測定する観察装置に備えられる落射照明装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 フォトアクチベーションに用いられる試薬の一つに、生理活性物質等の生体内の物質と結合してその物質本来の性質を不活性化させるCaged compoundと呼ばれる試薬がある。フォトアクチベーションでは、生体内物質を不活性化させたCaged compoundを生体組織に投与した後に、生体組織の所定領域に例えば、310～360 nmの近紫外光を照射する。その結果、近紫外光の照射域において生体内物質と当該試薬との結合が解除され、瞬時に生体内物質がもとの活性化状態に戻されるフォトリシス (photolysis) 反応が起こる。このフォトリシス反応を観察、測定する。

【0003】 このように、光照射によりその照射域を活性化させる手法がフォトアクチベーションである。逆に、光照射により光照射域を不活性化させて、そのフォトリシス反応を観察、測定する手法がフォトイニアクチベーションである。

【0004】 その他にも、同様のフォトリシス反応を利用してある特定領域に反応を起こし、その局部的な変化に応答した隣接領域の変化、他の領域への変化の伝搬、その経時変化を観察、測定する種々の手法が知られて

る。

【0005】 従来、フォトアクチベーション等におけるフォトリシス反応を起こすための装置として顕微鏡の落射蛍光投光管が用いられている。特開平4-336516号公報には、落射蛍光投光管を用いてフォトリシス反応を起こさせる顕微鏡が記載されている。

【0006】 この公開公報に記載された顕微鏡は、図3に示す様に、蛍光観察用の観察用照明光 (励起光) を生成する観察用照明光学系1と、標本上に観察用照明光とは異なる波長域のフォトリシス反応を起こさせるためのフォトリシス光を生成するフォトリシス用照明光学系2と、フォトリシス用照明光を観察用照明光学系1に導入するためのダイクロイックミラー3と、観察用照明光とフォトリシス光との標本上での照射範囲を一致させる視野絞り4と、標本からの光学情報を受ける観察光学系5とを備えている。

【0007】 この顕微鏡でフォトアクチベーションによる標本観察を行う場合は、標本である細胞にCaged compoundの一種であるCaged Calciumとカルシウムイオン用の蛍光試薬を注入する。

【0008】 次に、フォトリシス用照明光学系2の光源11からフォトリシスのための光を出射し、観察用照明光学系1の光源13から励起光のための光を出射する。これらの照明光はダイクロイックミラー3、12により細胞に照射されると共に、視野絞り4で細胞上における照射範囲が規制される。

【0009】 細胞上の所定領域に照射されたフォトリシス光によりCaged Calciumとカルシウムイオンの結合が解除されてカルシウムイオンが放出される。このカルシウムイオンが予め細胞内に注入されていたカルシウムイオン用蛍光試薬と結合する。一方、カルシウムイオンと結合した蛍光試薬は、観察用照明光学系1の励起光光源13からの励起光により励起されて蛍光を発する。その蛍光を観察光学系5を介して観察、測光する。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】 ところで、上述した装置は、蛍光観察用の励起光の照射範囲とフォトリシス反応を起こすためのフォトリシス光の照射範囲とを細胞上で一致させるため、視野絞りを双方の光束を制限し得る光路上に配置している。そのため、フォトリシス反応の起こった範囲以外の領域の蛍光観察を行う場合は、フォトリシス反応の終了後に視野絞りを広げてから観察しなければならない。

【0011】 一方で、生体内の物質の反応は極めて速い。例えば、フォトリシス光を照射後、約 1 msec でカルシウムイオンが放出され、又放出したカルシウムイオンをトリガとしてフォトリシス光の照射されていない隣接領域におけるカルシウムイオン濃度は数 μM ～ 数十 msec のオーダーで変化する。特に、標本が神経系の細胞等であれば、膜電位の刺激応答、神経伝達物質などの

反応はさらに速いことが知られている。

【0012】本来、Caged compoundは、この様な生体内の速い反応に対して、外から生体内へ人為的に物質を加えた場合の拡散の影響による、時間的、空間的なズレを除去するために用いられている試薬である。従って、局部にフォトリシス反応を起こさせた後に、視野絞りを広げ、フォトリシス反応の起こっていない隣接領域の観察を行う場合にはタイムラグが生じてしまい好ましくない。

【0013】また、フォトリシス反応を起こさせるためのフォトリシス用照明光は紫外光域の場合が多く、蛍光観察用の励起光は可視光域の場合が多いが、通常の蛍光観察に用いられる対物レンズは紫外域まで収差補正がなされていない。そのために、観察用照明光学系の光路とフォトリシス用照明光学系の光路とでは標本と共に観察用の光軸方向の位置が異なることとなる。また、フォトリシス用照明光学系における視野絞りの標本と共に光軸方向位置は、対物レンズの種類、フォトリシス用照明光の波長によっても異なる。

【0014】従って、観察用照明光学系とフォトリシス用照明光学系と共に共通の視野絞りを使用したり、視野絞りの光軸方向位置が固定の場合には、対物レンズの交換もしくはフォトリシス光の波長切換え等に起因する上記変化に対処することができず、標本上の視野絞りの像がボケた状態となるので、フォトリシス用照明光が不要な領域にまで照射されることとなり、優れた空間分解能で生体内での物質の変化を観察、測定できるといったフォトアクチベーションまたはフォトインアクチベーション本来の効果を減殺してしまうことになる。

【0015】本発明は、以上のような実情に鑑みてなされたもので、フォトリシス光の照射範囲よりも広い視野で蛍光観察を行うことができ、かつ、フォトリシス光の照射範囲を正確に規制することができ、時間的、空間的な分解能を改善できる落射照明装置を提供することを目的とする。

【0016】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するため本発明の落射照明装置は、標本からの光を結像して観察像を形成する観察光学系の光路上に波長選択性の光学素子を配置し、観察用照明光学系で生成した第1の照明光を前記波長選択性の光学素子に入射して前記観察光学系の光軸と同軸的に導光し、第1の照明光を前記標本に照射するものにおいて、前記標本にフォトリシス反応を起こさせるための第2の照明光を生成するフォトリシス用照明光学系と、前記観察用照明光学系の光路上であって前記標本と光学的に共役な位置に配置され、前記第1の照明光の照野を規制し、開口形状、寸法、光軸方向位置及び光軸に垂直な面内における開口位置の少なくとも一つが可変の第1の絞りと、前記フォトリシス用照明光学系の光路上であって前記標本と光学的に共役な位置に配置され、前

記第2の照明光の照野を規制し、開口形状、寸法、光軸方向位置及び光軸に垂直な面内における開口位置の少なくとも一つが可変の第2の絞りとを具備する構成とした。

【0017】

【作用】以上のように構成された本発明の落射照明装置では、第1の照明光を標本に照射するための観察用照明光学系の照野が第1の絞りで規制され、第2の照明光を標本に照射するためのフォトリシス用照明光学系の照野が第2の絞りで規制される。すなわち、各照明光学系に各々の照野を規制するための視野絞りが設けられており、各照明光毎に独立して、絞り形状、寸法、光軸方向位置、光軸に垂直な面内での位置の少なくとも一つが可変となっている。そのため、第1の照明光を使っての視野範囲と第2の照明光を使っての視野範囲とを独立に設定することができ、しかも第1、第2の絞りは対物レンズ、照明光の波長に対応して視野像がボケない位置まで各々独立に光軸方向へ移動することができ、標本への視野絞り像のフォーカスを行うことができる。

【0018】

【実施例】以下、本発明の実施例について説明する。図1には本発明の落射照明装置を備えた顕微鏡の実施例が示されている。本実施例の顕微鏡は、標本Sからの光を結像して標本像Mを形成する観察光学系21が顕微鏡本体に設けられ、励起光生成部22およびフォトリシス光生成部23を備えた落射蛍光投光管が顕微鏡本体に取付けられている。

【0019】観察光学系21は、その光軸21a上に標本S側から順に、対物レンズ24、ダイクロイックミラー25、吸収フィルター26、結像レンズ27が配置されている。後述する各種照明光で照明した標本Sからの光は、対物レンズ24に入射し、その対物レンズ24を通過した光束がダイクロイックミラー25および吸収フィルター26を介して結像レンズ27に入射し、所定の結像面に対物レンズ24及び結像レンズ27による標本像Mが形成され、この標本像Mと共に位置に配置された図示しない接眼レンズ、TVカメラ、写真カメラ、測光装置により観察及び測定される。

【0020】励起光生成部22は、励起光光源31から出射した光をコレクタレンズ32で集光した後、励起フィルタ33に入射して所望の蛍光色素を励起するに必要な波長のみを選択して第1の照明光としての励起光を生成する。そして観察照野を規制する第1の視野絞り34に励起光を通してから、励起光の波長域に透過波長帯域を持つダイクロイックミラー35に入射する。さらにダイクロイックミラー35を透過した励起光を視野絞り投影レンズ36に通してから上記観察光学系21に設けられたダイクロイックミラー25に入射している。ダイクロイックミラー25は蛍光波長域と透過波長域を持ち、励起光の入射角に対して45度に傾けられている。

蛍光照明光学系は、励起光生成部22、ダイクロイックミラー35、視野絞り投影レンズ36、ダイクロイックミラー25、対物レンズ24等から構成される。なお、ダイクロイックミラー35は光軸に対して挿脱自在になっている。

【0021】フォトリシス光生成部23は、フォトリシス用光源41から発生させた光をコレクタレンズ42で集光し、その光束を電子シャッター43を介してバンドパスフィルタ44に入射する。バンドパスフィルタ44は入射光束の中から標本にフォトリシス反応を起こさせるのに必要な波長を選択し第2の照明光としてのフォトリシス光を生成する。そのフォトリシス光を第2の視野絞り45を通してから上記ダイクロイックミラー35に入射している。ダイクロイックミラー35は、フォトリシス光の入射方向に対して45度の傾きを持っており、蛍光照明光学系の光軸と同軸的にフォトリシス光を導光する。フォトリシス用照明光学系は、フォトリシス光生成部23、ダイクロイックミラー35、視野絞り投影レンズ36、ダイクロイックミラー25、対物レンズ24等から構成される。

【0022】ここで、第1の視野絞り34は、視野絞り投影レンズ36により励起光生成部22の光路上に移された標本Sと光学的に共役な位置に配置されている。この第1の視野絞り34は、開口中心を光軸に一致させており、開口径が変化自在になっている。また必要に応じて光軸方向および光軸に垂直方向へ移動させることができるように構成されている。

【0023】また、第2の視野絞り45は、視野絞り投影レンズ36およびダイクロイックミラー35によりフォトリシス光生成部23の光路上に移された標本Sと光学的に共役な位置に配置されている。この第2の視野絞り45は、各々径の異なる開口部を有する複数の開口部材と、それら開口部材を選択的に光軸上に配置するシフトホルダー46とからなる。各開口部材は、その開口部がピンホール、細長いスリットなど種々の形状のものがあり、また同一形状であっても寸法または形成位置が異なるものが用意される。さらにシフトホルダー46内で開口部材を光軸と垂直方向に移動させることができ、かつ対物レンズノ種類に応じて異なる長さのスペーサ47等によりフォトリシス光生成部23を光軸方向へ移動させることができる。

【0024】次に、以上のように構成された本実施例の動作について説明する。先ず、励起光生成部22の光路上において標本Sと光学的に共役な位置に第1の視野絞り34を配置し、同様にフォトリシス光生成部23の光路上において標本Sと光学的に共役な位置に第2の視野絞り45を配置する。また第1の視野絞り34を蛍光観察の観察視野に対応した開口径位置に調節する。第2の視野絞り45では、フォトリシス反応を起こさせる標本上の位置、形状、大きさなどの条件を満足する開口部材

を選択して位置調節を行い光軸上に配置する。特に、第2の視野絞り45の開口は微小であるため、対物レンズ24固有の収差、フォトリシス光の波長により第2の視野絞り45の像がボケやすい。

【0025】本実施例では、第1の視野絞り34と第2の視野絞り45とが独立に調整可能となっているので、第2の視野絞り45を、第1の視野絞り35とは別に、対物レンズ24の収差およびフォトリシス光の波長を考慮してシャープな像を形成し得る位置に来るよう光軸方向へ微調整できる。

【0026】一方、標本SにCaged Compoundと蛍光試薬を注入し、その標本S内の所望の細胞を観察光学系21の光軸21a上へ移動し、観察光学系21の対物レンズ24の焦点を標本S表面に合わせる。

【0027】次に、フォトリシス用光源41および励起光光源35を駆動してフォトリシス用の照明光および蛍光観察用の照明光を発生する。フォトリシス用光源41から出射したフォトリシス光(a)は、コレクタレンズ42により集光され電子シャッター43を介してバンドパスフィルタ44に入射する。バンドパスフィルタ44はフォトリシス反応に有効で、かつ、標本Sにダメージを与えない波長を選択するよう設定されており、そのような波長の光、すなわちフォトリシス光が抽出される。このフォトリシス光(a)は第2の視野絞り45を通過することにより、第2の視野絞り45に挿入されている開口部材の開口形状にし応じた光束径となる。このように第2の視野絞り45を通過したフォトリシス光(a)はダイクロイックミラー35により観察用照明光学系の光軸と同軸的に導光される。そして観察光学系21の光軸21a上に配置されたダイクロイックミラー35で反射して、観察光学系21の光軸21aと同軸的に導光され、対物レンズ24を通じて標本Sに入射する。その結果、標本Sの照射領域ではフォトリシス反応が引き起こされる。

【0028】なお、フォトリシス反応後の標本内の比較的応答速度の遅い変化を観察、計測する場合は、比較的出力の低いフォトリシス用光源41を用い、数百msec～数secのフォトリシス光を照射する場合がある。このような場合には、電子シャッター43に照射時間を設定しておき、設定照射時間だけ電子シャッター43が開くように動作制御する。

【0029】逆に、フォトリシス反応後、数百μsec～数msecという極めて応答速度の速い変化を観察、計測する場合は、出力の大きいフラッシュランプ等をフォトリシス用光源41として用い、経時的変化を観察、測定する場合の計測時間の起点とする。この場合には電子シャッター43は使用しない。

【0030】また一方で、上記標本Sへは観察用照明光学系から励起光が照射される。すなわち、励起光源31から出力された照明光がコレクタレンズ32で集光さ

れ、所望の蛍光色素を励起するのに必要な波長が励起フィルタ33で抽出される。この励起光(b)は第1の視野絞り34を通過する際に所定の照射範囲となるように光束形状が規制される。この励起光(b)は、ダイクロイックミラー25により観察光軸21aと同軸的に導光され、視野絞り投影レンズ36および対物レンズ24により第1の視野絞り34で規制された観察照野で標本Sに照射される。第1の視野絞り34は上記第2の視野絞り45とは独立して開口径(観察照野)を自在に調整することができ、フォトリシス光による照明範囲よりも大きく又は小さくすることができる。

【0031】例えば、第1の視野絞り34による照野が第2の視野絞り45による照野よりも十分に大きくなるように、双方の視野絞り34, 45を調整した場合の観察視野の例を図2に示している。蛍光照明光学系の視野範囲となる照野50の中に所定の細胞S'が存在し、その細胞S'上の所定領域にフォトリシス光による照野51が形成されている。このフォトリシス光による照野51にフォトリシス反応が起こされる。具体的には、第1の視野絞り34を十分に大きな開口となるように調節し、第2の視野絞り45に中央にピンホールが形成された開口部材を選択した場合に、このような2つの観察照野が形成される。

【0032】以上のようにして標本Sに照射されたフォトリシス光によるフォトリシス反応が終了した後、活性化された蛍光色素もしくは活性化された生体内物質が予め標本S内に注入されていた蛍光色素と結合することにより、励起光(b)により励起され標本Sが蛍光cを発する。蛍光cは観察光学系21の対物レンズ24に入射し、ダイクロイックミラー25を透過して吸収フィルター26に入射する。吸収フィルター26で余分な波長がカットされた光が結像レンズ27により所定位置に像を結ぶ。この標本像は図示しない接眼レンズ、TVカメラ、測光装置等により観察または測定される。

【0033】ここで、標本上におけるフォトリシス光による照野(フォトリシス反応を起こさせる領域)を変更する場合は、第2の視野絞り45において任意の形状、寸法の開口部材を選択して開口部材を所望の位置に調節した後に、光軸上に配置する。蛍光照明光学系による蛍光観察の視野範囲を変更する場合には、第1の視野絞り34の開口径位置を調節する。

【0034】以上の操作により、励起光による照野50を再設定し、その照野50の範囲内の任意位置に、任意形状、任意寸法のフォトリシス光による照野51を設定できる。

【0035】なお、上記観察工程においてフォトリシス終了後は、ダイクロイックミラー35を光路から外した状態で蛍光観察を行うことが好ましい。ダイクロイックミラー35を光路から外すことにより、照明効率を上げることができるからである。

【0036】このように本実施例によれば、励起光生成部22およびフォトリシス光生成部23に、それぞれ独立して各々の照明光の照野を規制し、開口形状、寸法、光軸方向位置及び光軸に垂直な面内における開口位置が可変の第1の視野絞り34、第2の視野絞り45を備えたので、蛍光照明光学系の視野とフォトリシス用照明光学系の視野を独立して開口調整、フォーカス調整可能となる。従って、細胞S'の任意の局部にフォトリシス反応を起こし、蛍光観察はそれよりも広い視野で行うことが可能となる。その結果、フォトリシス反応を起こさせた領域以外への生体の物質、刺激の伝播をフォトリシス反応の開始と同時に時間的な遅れを生じることなく観察、測定することが可能である。

【0037】また本実施例によれば、第1、第2の絞り34、45を光軸方向へ移動可能にしたので、視野絞り像を対物レンズ24の色収差の影響を除去して投影可能となり、異なる対物レンズ24を使用する場合であっても、第1、第2の視野絞り34、45の像をシャープに結像させることができ、観察、測定精度の改善を図ることができる。

【0038】なお、上記実施例では、励起光生成部22の励起光とフォトリシス光生成部23のフォトリシス光とを同一のダイクロイックミラー25により観察光学系21の光軸21aに導いているが、異なるダイクロイックミラーで導光するようにしても良い。また励起光生成部22とフォトリシス光生成部23とは必ずしも同じレンズを使用する必要はなく、各々の光路に標本Sと共に位置にそれぞれ独立に視野絞りが配置されていれば良い。

【0039】また、上記実施例では第1の視野絞り34を開口径および光軸に垂直な方向の位置を可変にすると共に光軸方向へ移動可能に構成しているが、観察方法によっては、光軸方向位置を固定させても良い。また、第2の視野絞り45の像のボケをなくすのであれば、光軸方向への移動のみを可能にして開口形状等の可変機能を持たせなくともよい。本発明は上記実施例に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲内で種々変形実施可能である。

【0040】

【発明の効果】以上詳記したように本発明の落射照明装置によれば、観察照明光学系とフォトリシス用照明光学系の各々に視野範囲、光軸位置などを独立に可変の第1、第2の視野絞りを設けたので、フォトリシス光の照射範囲よりも広い視野で蛍光観察を行うことができ、かつ、フォトリシス光の照射範囲を正確に規制することができ、時間的、空間的な分解能を改善できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の落射照明装置を備えた顕微鏡の一実施例を示す図である。

【図2】図1に示す顕微鏡の観察光学系にて観察される

観察視野例を示す図である。

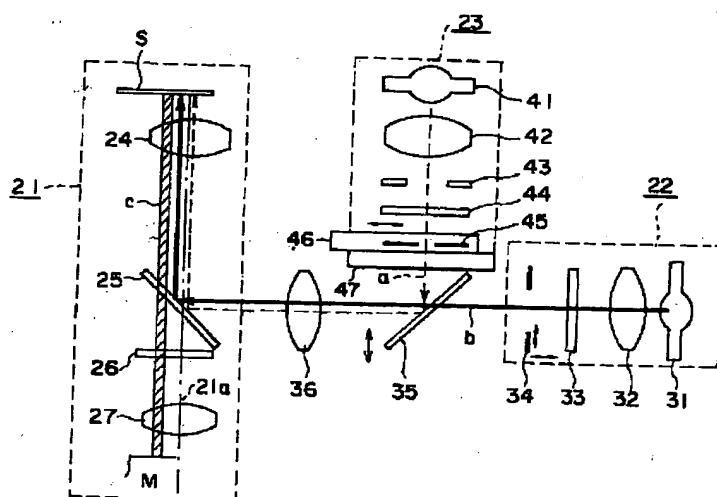
【図3】従来の落射投光管の構成図である。

【符号の説明】

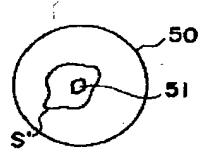
21…観察光学系、22…励起光生成部、23…フォトリシス光生成部、24…対物レンズ、25, 35…ダイ

クロイックミラー、26…吸収フィルター、27…結像レンズ、31…励起光光源、33…励起フィルター、34…第1の視野絞り、36…視野絞り投影レンズ、41…フォトリシス光源、44…バンドパスフィルタ、45…第2の視野絞り。

【図1】



【図2】



【図3】

